

Rec'd. ITO

11 APR 2003

10/530886

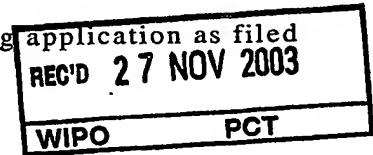
PCT/JP03/12968

09.10.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 0 月 1 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 2 9 8 5 4 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 2 9 8 5 4 9 ]

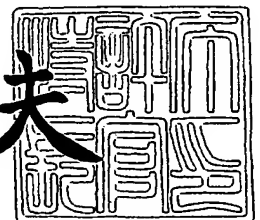
出 願 人                      山之内製薬株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 3 7 2

【書類名】 特許願  
【整理番号】 0000003198  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07K 14/00

## 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 小田 環

## 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 遠藤 英樹

## 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 上田 能孝

## 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 井鍋 一則

## 【特許出願人】

【識別番号】 000006677

【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100089200

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005348

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 CAP結合蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、CAPと結合するポリペプチド、あるいは配列番号2または4で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかもCAPと結合するポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、c-Cbl-associated protein (CAP) に結合する新規なポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードする新規なポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、及び該ベクターを含有する形質転換細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

インスリンは膵臓ランゲルハンス島の $\beta$ 細胞より分泌され、主に筋肉、肝臓、脂肪に作用して血中の糖を細胞に取り込ませて貯蔵、消費させることにより血糖値を降下させる。糖尿病は、このインスリンの作用不足から引き起こされるが、患者にはインスリンの生産・分泌に障害をもつ1型と、インスリンによる糖代謝促進が起こりにくい2型の2つのタイプが存在する。いずれの患者でも血糖値が健常人より高くなるが、1型では血中インスリンが絶対的に不足するのに対して、2型ではインスリンの存在にもかかわらず血糖の取り込み・消費が促進されないインスリン抵抗性が生じている。2型糖尿病は遺伝的素因に加えて過食や運動不足、

ストレスなどが原因となり惹起されるいわゆる生活習慣病である。今日先進諸国では摂取カロリーの増大に伴いこの2型糖尿病患者が急激に増加しており、日本では糖尿病患者の95%を占めている。そのため糖尿病の治療薬には単純な血糖降下剤のみでなく、インスリン抵抗性の改善により糖代謝を促進する2型糖尿病の治療を対象とした研究の必要性が高まっている。

現在1型糖尿病患者の治療にはインスリン注射製剤が処方されている。一方2型患者に処方される血糖降下剤としては、インスリン注射製剤に加えて膵臓の $\beta$ 細胞に作用してインスリンの分泌を促すスルホニル尿素系血糖降下剤(SU剤)や、嫌氣的解糖作用による糖利用の増大や糖新生の抑制、及び糖の腸管吸収を抑制する作用を持つビグアナイド系血糖降下剤の他、糖質の消化吸収を遅らせる痾ーグルコシダーゼ阻害剤が知られている。これらは間接的にインスリン抵抗性を改善するが、近年より直接的にインスリン抵抗性を改善する薬剤としてチアゾリジン誘導体が使われるようになった。その作用は細胞内へのブドウ糖の取り込みと細胞内におけるブドウ糖利用の促進である。このチアゾリジン誘導体はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ(peroxisome proliferator activated receptor: PPAR $\gamma$ )のアゴニストとして作用することが示されている(非特許文献1参照)。しかしチアゾリジン誘導体はインスリン抵抗性を改善するのみでなく、浮腫を惹起する副作用が知られている(非特許文献2-3参照)。この浮腫の惹起は心肥大をもたらす重篤な副作用なので、インスリン抵抗性改善のために、PPAR $\gamma$ にかわるより有用な創薬標的分子が求められている。

インスリン作用のシグナルは細胞膜上にあるインスリン受容体を介して細胞内へ伝達される。このインスリンの作用経路には第一と第二の2経路が存在する。(非特許文献4参照)。第一経路においては、活性化されたインスリン受容体からIRS-1及びIRS-2、PI3キナーゼ、PDK1を介してAkt1(PKB $\alpha$ )あるいはAkt2(PKB $\beta$ )、またはPKC $\lambda$ あるいはPKC $\xi$ へ順次シグナルが伝達され、結果として細胞内に存在するグルコーストランスポーターGLUT4を細胞膜上へ移行させることにより、細胞外からの糖の取り込みを促進する。(非特許文献5参照)。一方、第二経路ではインスリン受容体からc-Cbl及びCAPを介してCrk I I、C3G、及びTC10へ順次シグナルが伝達され、結果GLUT4による糖の取り込みを促進する(非特許文献

6 参照)。しかし、これらインスリンシグナル伝達経路の詳細についてはいまだ不明な部分が多く、特にこれらのシグナルが最終的にどのような機構を経てグルコーストランスポーターを介した細胞の糖取り込みを促進するのか明らかではない。

CAPはインスリンシグナル第二経路に存在するアダプタータンパク質で、インスリン感受性組織である肝臓、骨格筋、腎臓や心臓で強く発現している(非特許文献7 参照)。またCAPの発現はPPAR $\gamma$  のアゴニストであるチアゾリジン誘導体によって亢進することが知られている(非特許文献8 参照)。CAPはそのC末端側にあるSH3ドメインを介してc-Cblと結合する。このCAP/c-Cbl複合体はインスリンシグナルに応答してCrkII-C3G複合体を介してTC10を活性化し、グルコーストランスポーターGLUT4の細胞膜への移行を促進する。c-Cblとの結合ドメインであるSH3を欠損させたCAPは、PI3キナーゼ活性には影響は与えないが、細胞の糖取り込みを阻害することが報告されている(非特許文献9 参照)。これらの事実から、CAPはc-Cblとの結合に依存して細胞内への糖取り込みに働くシグナル仲介因子であり、その機能阻害はインスリンシグナル伝達の部分的な遮断によりインスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病様態を引き起こすと考えられている。

#### 【0003】

【非特許文献1】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、1995年、第270巻、p. 12953-12956

【非特許文献2】「ダイアビーズ フロンティア (Diabetes Frontier)」、(米国)、1999年、第10巻、p. 811-818

【非特許文献3】「ダイアビーズ フロンティア (Diabetes Frontier)」、(米国)、1999年、第10巻、p. 819-824

【非特許文献4】「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (The Journal of Clinical Investigation)」(米国)、2000年、第106巻、第2号、p. 165-169

【非特許文献5】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」、(

米国)、1999年、第274巻、第4号、p. 1865-1868

【非特許文献6】「ネイチャー (Nature)」、(英国)、2001年、第410巻、第6831号、p. 944-948

【非特許文献7】「モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)」(米国)、1998年、第18巻、第2号、p. 872-879

【非特許文献8】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、2000年、第275巻、第13号、p. 9131-9135

【非特許文献9】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、2001年、第276巻、第9号、p. 6065-6068

【非特許文献10】「モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)」(米国)、2002年、第22巻、第11号、p. 3599-3609

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、CAP蛋白質の作用を制御する分子を提供することを課題とする。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上述の知見からCAPの働きを増強させることができれば、インスリン抵抗性を改善できると考えた。そしてこの目的は、アダプター蛋白質であるCAPに結合してその作用を制御している細胞内因子を同定し、その作用を調節することにより達成できると考えた。そこでCAPに結合する蛋白質を、酵母ツーハイブリッドシステムにより同定した。その結果、インスリン応答組織である骨格筋に発現している蛋白質CAPBP1 (CAP binding protein 1) をコードする新規な塩基配列のヒト由来cDNAのクローニングに成功した。さらに同蛋白質のマウスオルソログは糖尿病モデルマウスの筋肉組織において正常個体より発現量が顕著に増加していることから同蛋白質が糖尿病態の原因因子であることを見出し、本発

明を完成させた。

### 【0006】

すなわち、本発明は、

〔1〕（１）配列番号２または４で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、CAPと結合するポリペプチド、あるいは（２）配列番号２及び４で表されるアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかもCAPと結合するポリペプチド、

〔2〕配列番号２または４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

〔3〕請求項１又は請求項２に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

〔4〕請求項３に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

〔5〕請求項４に記載の発現ベクターで形質転換された細胞に関する。

### 【0007】

CAPに結合する性質を有し、糖尿病態において発現量が増加する本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドは、糖尿病の診断に有用である。また、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞は糖尿病治療剤のスクリーニングに有用である。本発明の遺伝子のアンチセンスオリゴの利用は糖尿病治療への利用が可能である。本発明のポリヌクレオチドを検出できるPCR用プライマーを利用することにより、糖尿病の診断が可能である。

<本発明のポリペプチド>

本発明のポリペプチドには、

（１）配列番号２または４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（２）配列番号２または４で表されるアミノ酸配列を含み、しかもCAPに結合するポリペプチド、あるいは、配列番号２または４で表されるアミノ酸配列において、１～１０個（好ましくは１～７個、より好ましくは１～５個、更に好ましくは１～３個）のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかもCAPに結合するポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）

；及び



(3) 配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列との相同性が 90% 以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、CAP に結合する蛋白質であるポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）；

が含まれる。

本発明の相同ポリペプチドは、配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列との相同性が 90% 以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、CAP に結合するポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは 95% 以上、更に好ましくは 98% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、Clustal program (Higgins and Sharp, Gene 73, 237-244, 1998; Thompson et al. Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680, 1994) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Alignment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

また、本発明のポリペプチドは、他の脊椎動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヒツジ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ブタ、ニワトリなど）由来のものも包含する。

### 【0008】

<本発明のポリヌクレオチド>

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド、すなわち、配列番号 2 または 4 に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチド、その機能的等価改変体、または、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。また、同じ分子種として同定されるものであればいずれの種由来のものであってもよい。好ましくは、配列番号 2 または 4 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号 1 または 3 に記

載の塩基配列である。なお、本明細書における「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

#### 【0009】

本発明のポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする限り、あらゆる変異体を含むことが出来る。より具体的には天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加及び挿入を有する変異体を含むことが出来る。前記の変異は、例えば天然において突然変異によって生じることもあるが、人為的に改変・作製することも出来る。本発明は、上記ポリヌクレオチドの変異の原因及び手段を問わず、上記本発明のポリペプチドをコードする全ての変異遺伝子を包含する。上記の変異体作製にいたる人為的手段としては、例えば塩基特異的置換法(Methods in Enzymology、(1987)154、350、367-382)等の遺伝子工学的手法の他、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイド法などの化学合成手段(Science (1968)150,178)を挙げることができる。それらの組み合わせによって所望の塩基置換を伴うDNAを得ることが可能である。あるいはPCR法の繰り返し作業や、その反応液中にマンガニオンなどを存在させることによりDNA分子中の非特定塩基に置換を生じさせることが可能である。

#### 【0010】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、本発明により開示された配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することが出来る。

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば次のように得ることができるが、この方法に限らず公知の操作「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]でも得ることができる。

例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法(すなわちcDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法)を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、W001/34785に記載されているのと同様に実施できる。

PCRを用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法a) 第1製造法に記載された手順により、本明細書記載のポリヌクレオチドを製造することができる。該記載において、「本発明の蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織」とは、例えば、ヒト骨格筋を挙げることができる。ヒト骨格筋からmRNAを抽出する。次いで、このmRNAをランダムプライマーまたはオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖cDNAを合成することが出来る。得られた第一鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば実施例1に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法b) 第2製造法に記載された手順により、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法c) 第3製造法、d) 第4製造法に記載された方法によって、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

#### 【0011】

このようにして得られる本発明のポリヌクレオチドの一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを特異的に検出することが出来る。

かかる検出方法としては、RT-PCR (Reverse transcribed-Polymerase chain reaction)、ノーザンブロッティング解析、in situ ハイブリダイゼーションなどの方法を挙げることが出来る。RT-PCRによって本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出する場合に用いられるプライマーは、該ポリヌクレオチドのみを特異的に増幅できるものである限り特に制限は無く、本発明のポリヌクレオチドの配列情報に基づいて適宜設定することが出来る。本発明のポリヌク

レオチドを特異的に増幅するプライマーは、本発明のポリヌクレオチドを検出するための特異プライマー及び特異プローブとして利用できる。

#### 【0012】

##### <本発明の発現ベクター及び細胞>

上述のように得られた本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、  
「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]等に記載の方法により、適当なプロモーターの下流に連結することで本発明のポリペプチドを試験管内、あるいは試験細胞内で発現させることに利用できる。

具体的には上述のように得られた本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5' 側にある本発明のポリペプチドの開始コドン上流に特定のプロモーター配列を含むポリヌクレオチドを付加することにより、これを鋳型として用いた無細胞系での遺伝子の転写、翻訳による本発明のポリペプチドの発現が可能である。

あるいは上述の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクタープラスミドに組み込み、プラスミドの形で宿主細胞に導入すれば細胞内で本発明のポリペプチドの発現が可能になる。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。より具体的には、単離されたポリヌクレオチドを含む断片は、適当なベクタープラスミドに再び組込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において本発明のポリペプチドを発現させることが可能である。宿主細胞は、特に限定されるわけではなく、本発明のポリペプチドの発現量をメッセンジャーRNAレベルで、あるいは蛋白質レベルで検出できるものであればよい。内在性のCAPが豊富に存在する脂肪由来細胞、あるいは筋由来細胞を宿主細胞として用いることがより好ましい。

宿主細胞を形質転換し遺伝子を発現させる方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白質の製造方法に記載された方法により実施できる。発現ベクターは、所望のポ

リヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではない。例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、所望のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。本発明の細胞は、例えば、前記発現ベクターにより所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、実施例 2 に記載のように所望のポリヌクレオチドを哺乳類動物細胞用の発現ベクター pcDNA3.1 に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターをリポフェクトアミン法を用いて COS-1 細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により所望の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択できる。例えば上記 COS-1 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

#### 【0013】

本発明の細胞を培養することにより、細胞中で産生した本発明のポリペプチドを検出、定量、さらには精製することが出来る。例えば、本発明の本発明のポリペプチドと結合する抗体を用いたウエスタンブロット法、あるいは免疫沈降法により本発明のポリペプチドを検出、精製することが可能である。あるいは、本発明のポリペプチドを、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、プロテイン A、竈ーガラクトシダーゼ、マルトースーバインディングプロテイン (MBP) など適当なタグ蛋白質との融合蛋白質として発現させることにより、これらタグ蛋白質に特異的な抗体を用いてウエスタンブロット法、あるいは免疫沈降法により本発明のポリペプチドを検出、タグ蛋白質を利用して精製することが出来る。あるいは所望により、該蛋白質の物理的性質、化学的性質を利用した各種の分離操作によっても精製できる。具体的には限外濾過、遠心分離、ゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーの利用を例示することが出来る。

#### 【0014】

本発明の本発明のポリペプチドは、配列番号 2 または 4 に示すアミノ酸配列情報に従って、一般的な化学合成法により製造することが出来る。具体的には液相、及び固相法によるペプチド合成法が包含される。合成はアミノ酸を 1 個ずつ逐次結合させても、数アミノ酸からなるペプチド断片を合成した後に結合させてもよい。これらの手段により得られる本発明ポリペプチドは前記した各種の方法に従って精製を行うことが出来る。

#### 【0015】

##### ＜アンチセンスDNA及びウイルスベクター＞

後述の実施例 3 に示すように配列番号 1 または 3 で表される本発明の本発明のポリヌクレオチドは骨格筋の組織において発現が認められる。よって本発明のポリペプチドをコードするDNAのアンチセンスDNAの全部または一部を包含する任意の遺伝子発現ベクターあるいは化学的修飾により安定化したアンチセンスDNA断片そのものを骨格筋組織で作動させることにより本発明のポリヌクレオチドの翻訳を阻害し、強制的に本発明のポリペプチドの発現を抑制することが出来る。これにより骨格筋におけるCAPの活性を調整してインスリンシグナル第二経路を介した糖取り込みを制御することが可能となり、結果として糖代謝を制御できる。このようにして得られる培養細胞及びモデル動物は糖尿病治療剤のスクリーニングに有用である。

また本発明のポリペプチドの全部または一部を包含する任意のウイルスベクターを作製し、該ウイルスを骨格筋組織に感染させて作動させることにより、細胞内で本発明のポリヌクレオチドの発現を強制的に亢進させ、本発明のポリペプチド蛋白質量を増大させることができる。これにより骨格筋におけるCAPの活性を調整し、インスリンシグナル第二経路を介した糖取り込みを制御することが可能となり、結果として糖代謝を制御できる。

#### 【0016】

アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。

化学的修飾により安定化したアンチセンスDNA断片は、例えば本発明のポリペ

チドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号 1 または 3 に記載の DNA）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 16, 3209-21 (1988)）により作製することができる。上述のアンチセンス DNA の骨格筋組織の細胞への導入方法としてはリン酸カルシウム法、リポソーム法などを挙げることができる。

上述のアンチセンス DNA あるいはウイルスベクター利用において、骨格筋における強制発現の具体的な方法としては、例えば骨格筋アクチン、ミオシン重鎖、クレアチンキナーゼなどのプロモーターの利用を例示できる。

上述のウイルスベクターの具体例としては、レトロウイルスベクター (McLachlin J R (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91, 6186-6196)、アデノウイルスベクター (Tong-Chuan He (1998) Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 95, 2509-2514) の利用を例示できる。

本発明に依れば、本発明のポリヌクレオチド発現用のウイルスベクターを有効成分として含有する医薬、とくに糖代謝を改善するために使用される当該医薬が提供される。

#### 【0017】

##### <インスリン抵抗性改善薬及び糖代謝改善薬のスクリーニング方法>

本発明のポリペプチドを使用し、本発明のポリペプチドと CAP との相互作用を利用して、CAP と c-Cbl の結合の変化を指標とすることからなる糖代謝改善作用を有する物質のスクリーニング方法を構築できる。

上記スクリーニング方法の一つの実施態様としては、本発明のポリペプチドの一部あるいは全長域を発現させた試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における被験物質による CAP と c-Cbl との結合の量的あるいは質的变化を指標とすることからなる糖代謝改善作用を有する物質のスクリーニング方法が挙げられる。

本発明のスクリーニング法で使用する被検物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物（ペプチドを含む）、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミスト

リー技術(N.Terrett et al., Drug Discov. Today, 4(1):41, 1999 )によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

#### 【0 0 1 8】

##### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（「Molecular Cloning」 Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等）に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

#### 【0 0 1 9】

##### <実施例 1>CAPBP1遺伝子のクローニングと発現ベクターの構築

###### (1) CAPのクローニング

遺伝子データベースGenbankのアクセッション番号U58883に記載されたマウスCAP (c-Cbl associated protein)の全長領域をコードするcDNA配列を参照して、mCAP-5HS, mCAP-1, mCAP-2, mCAP-3SEと命名した以下の4つのオリゴヌクレオチドをプライマーとして設計した（配列番号5-8）。mCAP-5HSには制限酵素Hind I I Iサイトを、またmCAP-3SEには制限酵素EcoRIサイトを各プライマーの5'側に付加してある。

15週齢のオスのC57BL/6Jマウス（日本クレア社）の骨格筋から全RNAを調製して逆転写により1本鎖cDNAを作成し、CAP遺伝子クローニングのためのPCRの鋳型として用いた。ここで全RNAはRNA抽出用試薬（Isogen；ニッポンジーン社）を用いて説明書に従い調製した。調製した全RNAはその後デオキシリボヌクレアーゼ（ニッポンジーン社）を用いて処理し、フェノール／クロロホルム処理、エタノール沈殿して滅菌水に溶解した。全RNAから1本鎖cDNAへの逆転写は、1 $\mu$ gの全RNAを逆転写反应用キット（Advantage<sup>TM</sup> RT-for-PCR Kit；クロンテック社）を用いて20 $\mu$ lの系で行った。



配列番号 5 と配列番号 6 のプライマーの組み合わせにより CAP の N 末側半分をコードする遺伝子を、また配列番号 7 と配列番号 8 のプライマーの組合せにより CAP の C 末側半分をコードする遺伝子をそれぞれ PCR を用いて増幅した。PCR は上述の 1 本鎖 cDNA を  $5\mu\text{l}$ 、PyroBEST DNA Polymerase (宝酒造社) を  $0.5\mu\text{l}$ 、プライマーを各  $50\text{pmol}$  用いて、全量  $50\mu\text{l}$  の反応系で行った。温度条件は  $95^{\circ}\text{C}$  で 3 分おいたのち、 $98^{\circ}\text{C}$  で 10 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  で 30 秒、 $74^{\circ}\text{C}$  で 90 秒の 3 ステップからなる工程を 40 サイクル繰り返し、最後に  $74^{\circ}\text{C}$  で 7 分反応させた。

次に増幅断片を制限酵素 EcoRV で消化したプラスミド pZErO-2.1 (インビトロジェン社) にサブクローニングした。サブクローニングした遺伝子断片の塩基配列はシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて決定し、報告されている塩基配列と一致することを確認した。

PCR で増幅された N 末側半分をコードする遺伝子断片の 3' 側と C 末側半分をコードする遺伝子断片の 5' 側は、CAP 遺伝子に内在性にただひとつ存在する制限酵素 SacI サイトをどちらも有している。よって N 末側半分をコードする遺伝子断片は制限酵素 HindIII と SacI を用いて、また C 末側半分をコードする遺伝子断片は制限酵素 SacI と EcoRI を用いてそれぞれサブクローニングされたプラスミドから切り出すことができ、それらを制限酵素 HindIII と EcoRI で消化したプラスミド pcDNA3.1(+) (インビトロジェン社) に同時にライゲーションすることによりマウス CAP 遺伝子の全長がクローニングできた。

## (2) 酵母ツーハイブリッド用発現プラスミドの作製

マウス CAP の cDNA を酵母ツーハイブリッド用発現ベクター pDBtrp (インビトロジェン社) に挿入するため、マウス CAP 遺伝子配列のそれぞれ 5' 側及び 3' 側に pDBtrp ベクターのマルチクローニングサイトの前後 40 ヌクレオチドと相同な領域を付加した配列番号 9 及び 10 に示すプライマーを設計した。PCR は上述でクローニングしたマウス CAP プラスミドを鋳型として、DNA ポリメラーゼ (Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社) を用い、 $98^{\circ}\text{C}$  (1 分) の後、 $98^{\circ}\text{C}$  (5 秒)、 $55^{\circ}\text{C}$  (30 秒)、 $72^{\circ}\text{C}$  (5 分) のサイクルを 35 回、繰り返した。その結果得られた DNA 断片はマウス CAP 遺伝子の全コード領域を有している。

制限酵素 SalI 及び NcoI で切断して直鎖上にしたベクター pDBtrp 及び上記で得られ

たマウスCAPのcDNAを含むPCR断片を同時にツーハイブリッド用酵母株MaV203（インビトロジェン社）へ添加し、リチウム酢酸法により形質転換した(Guthrie C. and Fink R. , Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic, San Diego, 1991年)。その結果同酵母細胞内で相同組換えが生じ、pDBtrpのマルチクローニングサイトにマウスCAP cDNAが挿入されたプラスミド（以下pDB-CAPと略称する）が形成された。同プラスミドを有する酵母細胞を、プラスミドの選択マーカーであるトリプトファンを欠乏させた固形合成最小培地（DIFCO社）（20%アガロース）上にて培養することにより選択し、同酵母細胞をザイモリエース（生化学工業）で室温にて30分処理した後、アルカリ法でプラスミドを単離精製し、シーケンシングキット（アプライドバイオシステム社）及びシーケンサー（ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社）を用いて塩基配列の決定を行い、CAPのcDNAが、pDBtrpのGAL4 DNA結合領域のコード領域と翻訳フレームが一致して挿入されているものを選択した。

### （3）酵母ツーハイブリッドスクリーニング

上述のpDB-CAPにより形質転換したツーハイブリッド用酵母株MaV203を400mlのYPD液体培地(DIFCO社)に懸濁し、波長590ナノメートルの吸光度が0.1から0.4になるまで30℃で約6時間振とう培養した後、リチウム酢酸法でコンピテントセルとし、最終量を1.0mlの0.1M リチウム-トリス緩衝液に懸濁した。同細胞をヒト骨格筋ライブラリー（クロンテック社Match Maker cDNA library）各20 $\mu$ gで形質転換し、同細胞をpDB-CAP及びライブラリーそれぞれのプラスミドの選択マーカーであるトリプトファン、ロイシンを欠乏させた固形合成最小培地（DIFCO社）（20%アガロース）上にて培養することにより選別し、両プラスミドが導入された形質転換株を得た。同時に同じ形質転換細胞をトリプトファン、ロイシンのほかに、ツーハイブリッドシステムにおいて人工的に発現させたGAL4 DNA 結合領域の融合蛋白質に、GAL4 転写促進領域の融合蛋白質が結合した場合に発現するレポーター遺伝子HIS3が作動した細胞を選択するため、ヒスチジンを培地から除き、さらにHIS3がコードする酵素の阻害剤である3AT(3-AMINO-1, 2, 4-TRIAZOLE; シグマ社)20mMを添加した固形最小培地（20%アガロース）上で30℃で5日間培養した。同条件下でCAPに結合する蛋白質を発現していることを示す3AT耐性の酵母

のコロニーを取得した。これらの酵母細胞を24時間YPD固形培地上で成長させた後、HIS3とは別のツーハイブリッド システムの結合指示レポーターであるlacZ 遺伝子の発現を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として調べた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は培地上の酵母細胞をニトロセルロースフィルターに移し取り、液体窒素に付けて凍結させた後、室温で解凍し、フィルターを0.4%のX-GAL(シグマ社) 溶液を浸した濾紙上にのせて37℃で24時間静置し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ青色変化を測定した。フィルター上に写し取った細胞内容物が白色から青色に変化したコロニーを選択することにより、CAPに結合する蛋白質を発現している酵母細胞を特定し、同細胞からクロンテック社Yeast Protocols Handbookの方法に従ってライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を、配列番号11で表される塩基配列 (GAL4 AD領域に結合する配列; GenBankアクセッション番号 U29899 Cloning vector pACT2 由来) をプライマーとし、シーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した結果、配列番号1に示す塩基配列を含む1クローンと配列番号1の第64番目から9塩基挿入のある配列番号3に示す塩基配列を含む2クローンが含まれていることを確認した。

#### (4) CAPBP1遺伝子の全長cDNAのクローニング

前述(3)の結果、配列番号1及び3で表される塩基配列の全長を含む遺伝子断片を持ったライブラリー由来のプラスミド各1と配列番号1で表される塩基配列の第16番目の塩基以降の配列を含むライブラリー由来のプラスミドがそれぞれ得られ、CAPに結合する因子の存在が示された。そこで配列番号1で示された塩基配列の第525番目から第504番目の塩基配列の相補鎖に相当する配列番号12で表される塩基配列のプライマーを合成(プロリゴ社)し、該プライマーと配列番号11で表される塩基配列のプライマーを用いて前述の骨格筋由来cDNAライブラリー中からPCR法により全長cDNAの増幅を試みた。PCR反応はDNAポリメラーゼ (TAKARA LA Taq; 宝酒造社) を用い、94℃(3分)の後、94℃(30秒)・58℃(1.5分)・72℃(4分)のサイクルを35回繰り返し、そのPCR産物を鋳型にしてさらに同じ条件でPCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した結果、約600塩

基対のDNA断片が増幅されたことを確認した。そこで反応液中の同DNA断片を発現ベクター (pcDNA3.1/V5-His-TOPO; インビトロジェン社) にTOPO TA Cloning システム (インビトロジェン社) を用いてクローニングした。得られたプラスミド中の挿入DNA断片の塩基配列を、ベクター上のT7 プロモーター領域に結合するプライマー (TOPO TA Cloning kit/インビトロジェン社; 配列番号13) とシーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した。その結果、配列番号1または3に示すDNA配列を含むクローンであることを確認し、配列番号1または3よりさらに5' 側上流に約250塩基対のDNA断片の付随が認められたが、配列番号2または4に示すアミノ酸配列をコードするDNAのトリプレットに従うと配列番号1及び3の初めにあるATG (開始コドン) より上流には別の開始コドンは認められず、ストップコドンのトリプレットが存在した。これにより配列番号1及び3に示す遺伝子のオープンリーディングフレームを確定した。この遺伝子をCAPBP1遺伝子と名付けた。

#### (5) CAPBP1発現ベクターの作製

前述(4)で得られたCAPBP1遺伝子の全長配列を含むプラスミドから、配列番号1及び3に示す塩基配列情報に従い、正味CAPBP1蛋白質をコードするCAPBP1 cDNAを、配列番号14、及び配列番号12を用いてPCR法により増幅した。これら2種類のDNAプライマーはそれぞれ配列番号1または3に示すCAPBP1遺伝子の5' 側、3' 側の短い配列部分と相同な塩基配列を有する。配列番号12に示すプライマーはクローニング後3' にベクター由来のV5エピトープ (paramyxovirus SV5 のV protein由来、Southern J A (1991) J. Gen. Virol. 72, 1551-1557, 1991) 及びHIS6タグ (Lindner P (1997) BioTechniques 22, 140-149) がCAPBP1遺伝子のトリプレットと同じフレームで続くように、CAPBP1のストップコドン配列が除かれるよう設計した。PCR反応はDNAポリメラーゼ (TAKARA pyrobest; 宝酒造社) を用い、98℃ (1分) の後、98℃ (5秒) ・ 58℃ (30秒) ・ 72℃ (2分) のサイクルを40回繰り返した。その結果得られた525塩基対および534塩基対のCAPBP1 cDNAをそれぞれ含むDNA断片を、前述の発現ベクターpcDNA3.1/V5-His-TOPOにクローニングした。得られたプラスミド中の挿入DNA断片の塩基配列を上述(4)と同様にして決定した結果、配

列番号 1 および 3 に示す DNA 配列の 3' 側のストップコドンを除いた DNA がそれぞれ挿入されていることを確認した。以下これらの発現プラスミドのうち配列番号 1 の配列を含むものを pcDNA-CAPBP1 (-)、配列番号 3 の配列を含むものを pcDNA-CAPBP1 (+3) と略記する。

### 【0020】

#### <実施例 2> CAPBP1 蛋白質を発現する培養細胞の作成

##### (1) CAPBP1 発現細胞の作成

上述の実施例 1 (5) で作成した発現プラスミド pcDNA-CAPBP1 (-) および pcDNA-CAPBP1 (+3) をそれぞれ COS-1 細胞に導入した。COS-1 細胞は 6 ウェル培養プレート (ウェル直径 35mm) の培養皿に各ウェル 2ml の 10% 牛胎児血清 (シグマ社) を含む最少必須培地 DMEM (ギブコ社) を加えて 70% コンフルエントの状態になるまで培養した。この細胞にリン酸カルシウム法 (Graham et al., Virology, 52, 456, 1973; 新井直子、遺伝子導入と発現/解析法 13-15 頁 1994 年) により、pcDNA-CAPBP1 (-) あるいは pcDNA-CAPBP1 (+3) (1.0  $\mu$ g/ウェル) を一過性にトランスフェクトした。48 時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液 (以下 PBS と略称する) で洗浄した後にウェルあたり 0.1 ml の細胞溶解液 (100mM リン酸カリウム (pH 7.8)、0.2% トリトン X-100) を添加して細胞を溶解した。

##### (2) CAPBP1 蛋白質の検出

上述 <実施例 2> (1) の CAPBP1 発現細胞の溶解液 10  $\mu$ l に 10  $\mu$ l の 2 倍濃度 SDS サンプルバッファー (125mM トリス塩酸 (pH 6.8)、3% ラウリル硫酸ナトリウム、20% グリセリン、0.14M  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.02% ブロムフェノールブルー) を添加し、100℃ で 2 分間処理した後、10% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、試料中に含まれている蛋白質を分離した。セミドライ式ブロッティング装置 (バイオラッド社) を用いてポリアクリルアミド中の蛋白質をニトロセルロース膜に転写した後、常法に従いウエスタンブロッティング法により該ニトロセルロース上の CAPBP1 蛋白質の検出を行った。一次抗体には CAPBP1 の C 末端に融合させた V5 エピトープを認識するモノクローナル抗体 (インビトロジェン社) を用い、二次抗体にはラビット IgG-HRP 融合抗体 (バイオラッド社) を用いた。45 アミノ酸からなる C 末端側のタグを含む 220 あるいは 223 アミノ酸からなる CAPBP1-V3

-HIS6融合蛋白質を示す約24kDaの蛋白質が発現ベクターpcDNA-CAPBP1 (-) あるいはpcDNA-CAPBP1 (+3) の存在に依存して検出されることを確認した。これにより、培養細胞中でクローニングした前述のCAPBP1遺伝子は全長領域が確かに発現し、蛋白質として安定な構造をとることが明らかになった。

#### 【0021】

##### <実施例3> CAPBP1遺伝子の組織別発現分布解析

CAPBP1蛋白質はCAPと相互作用することから、該蛋白質はインスリンに応答する組織で発現し、インスリンシグナル第二経路に作用することが予想された。そこで上述の配列番号12、及び配列番号14に示すCAPBP1に相同な一对のプライマーを用いて、配列番号1あるいは3に示すCAPBP1遺伝子の全長cDNA断片を、各種組織由来cDNAからPCR反応を用いて増幅を試み、各種組織におけるCAPBP1の発現の有無を調べた。ヒト骨髄、脳、軟骨、心臓、腎臓、白血球、肝臓、肺、リンパ球、乳腺、卵巣、脾臓、胎盤、前立腺、骨格筋、HeLa細胞由来のcDNAライブラリー（クロンテック社）各1 $\mu$ gをテンプレートとしてDNAポリメラーゼ(AmpliTaq<sup>(r)</sup> DNA polymerase; アプライドバイオシステム社)を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)、58℃(30秒)、72℃(1.5分)のPCRサイクルを35回繰り返した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した結果、骨格筋、HeLa細胞、脳、リンパ球、乳腺由来の各cDNAライブラリーからは所望するCAPBP1の部分断片を含むと思われる約500塩基対のDNA断片が増幅された。これらのDNA断片を各々アガロースゲル中から分離した後、上述の<実施例1>(4)に記した方法に従い配列番号14に示すプライマーを用いて該DNA断片の塩基配列をそれぞれ決定した結果、配列番号1あるいは3に示したCAPBP1と同一の配列を有することが確認された。このことから、配列番号1、3で示される本発明CAPBP1遺伝子の発現は、インスリンシグナルに応答する骨格筋を含む限定された臓器で特異的に制御されていることが判明した。

#### 【0022】

##### <実施例4> 正常及び糖尿病モデルマウスにおけるCAPBP1発現量の測定

上述の知見により本発明のCAPBP1蛋白質はCAPと結合し、骨格筋などのインスリン応答組織で発現していることが判明した。CAP蛋白質はインスリンシグナル第

二経路に作用する因子であることから、本発明CAPBP1の作動の様態がインスリン抵抗性に関わることが予想された。そこで2種類の糖尿病モデルマウスKKAY/Ta (Iwatsuka et al. Endocrinol. Japon.: 17, 23-35, 1970、Taketomi et al., Horm. Metab. Res., 7, 242-246, 1975)、およびC57BL/KsJ-db/db (Chen et al., Cell, 84, 491-495, 1996、Lee et al., Nature, 379, 632-635, 1996、Kaku et al., Diabetologia, 32, 636-643, 1989)の骨格筋におけるCAPBP1遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)発現量を測定し、比較した。

遺伝子発現量は、本発明CAPBP1遺伝子のマウスオルソログの発現量を測定し、同時に測定したグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)) 遺伝子の発現量により補正した。測定系としてはPRISM™ 7700 Sequence Detection SystemとSYBR Green PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)を用いた。本測定系においてはPCRで増幅された2本鎖DNAがとりこむSYBR Green I色素の蛍光量をリアルタイムに検出・定量することにより、目的とする遺伝子の発現量が決定される。

具体的には、以下の手順により測定した。

#### (1) 全RNAの調製

全RNAはRNA抽出用試薬 (Isogen; ニッポンジーン社) を用いて説明書に従い、15週齢のオスのC57BL/6Jマウス、KKAY/Taマウス、C57BL/KsJ-dbm m+/m+マウス、C57BL/KsJ-dbm db/dbマウス (いずれも日本クレア社) の骨格筋から調製した。C57BL/6JマウスとC57BL/KsJ-dbm m+/m+マウスは健常マウス、KKAY/TaマウスとC57BL/KsJ-dbm db/dbマウスは2型糖尿病モデルマウスとして知られている。調製した全RNAはその後デオキシリボヌクレアーゼ (ニッポンジーン社) を用いて処理し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿して滅菌水に溶解し-20℃で保存した。

#### (2) 1本鎖cDNAの合成

全RNAから1本鎖cDNAへの逆転写は、0.25 µgのRNAを用い、逆転写反应用キット (Advantage™ RT-for-PCR Kit; クロンテック社) を用いて20 µlの系で行った。逆転写後、滅菌水180 µlを加えて-20℃で保存した。

#### (3) PCRプライマーの作成

CAP1403, CAP1404, G3PDH F, G3PDH Rと命名した以下の4つのオリゴヌクレオチド（配列番号15-18）を（4）の項で述べるPCRのプライマーとして設計した。CAPBP1遺伝子に対しては配列番号15と配列番号16の組合せ、G3PDH遺伝子に対しては配列番号17と配列番号18の組み合わせで使用した。

#### （4）遺伝子発現量の測定

PRISM™ 7700 Sequence Detection SystemによるPCR増幅のリアルタイム測定は25 $\mu$ lの系で説明書に従って行った。各系において1本鎖cDNAは5 $\mu$ l、2xSYBR Green試薬を12.5 $\mu$ l、各プライマーは7.5pmol使用した。なお検量線作成には、1本鎖cDNAに代えて0.1 $\mu$ g/ $\mu$ lのマウスゲノムDNA（クロンテック社）を適当に希釈したものを5 $\mu$ l用いた。PCRは、50℃で10分に続いて95℃で10分の後、95℃で15秒、60℃で60秒の2ステップからなる工程を45サイクル繰り返すことにより行った。

各試料におけるマウスCAPBP1遺伝子の発現量は、下記式に基づいてG3PDH遺伝子の発現量で補正した。

$$[\text{CAPBP1補正発現量}] = [\text{CAPBP1遺伝子の発現量（生データ）}] / [\text{G3PDH遺伝子の発現量（生データ）}]$$

上述の結果、図2に示す通り、本発明CAPBP1のマウスオルソログ遺伝子の発現は糖尿病モデルマウスの骨格筋において顕著に増加していることが判明した。従って本発明のCAPBP1は筋肉における機能亢進によりインスリン抵抗性を惹起すると考えられる。以上のことからインスリン抵抗性に本発明のCAPBP1の関与が大きいと結論づけられる。

また本実施例の結果より、CAPBP1発現量の測定により糖尿病病態の診断が出来ることが明らかとなった。

#### 【0023】

##### 【発明の効果】

CAPBP1はインスリンシグナルに関わる新たな新規分子であり、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞は、インスリン抵抗性改善薬並びに糖尿病改善薬の同定、及びスクリーニングに用いることが出来る。また、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドは糖尿病の診断に有用である。



## 【0024】

## 【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号5～10、12～18の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。配列番号11の配列で表される塩基配列は、クローニングベクターpACT2 (GenBank U29899) の第5183番目 (5') ～第5162番目 (3') の塩基からなる配列である。

## 【0025】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd

<120> CAP binding protein

<130> 3198IPY

<160> 18

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 528

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(525)

<223> Inventor: Oda, Tamaki; Endoh, Hideki; Ueda, Yoshitaka; Inabe, Kazunor

<400> 1

atg cgg cga tcg agg agc tct gcg gcc gcc aag ctg cgc ggg cag aag 48  
Met Arg Arg Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala Lys Leu Arg Gly Gln Lys  
1 5 10 15

cgg tcc ggg gcc tcc gcg gcc ccc gcg gcc tcc gcg gcc gct gcc ttg 96  
Arg Ser Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Ser Ala Ala Ala Leu  
20 25 30

gca ccc agc gcc acc cgc aca cgg cgc tcc gct agc cag gcc ggg agc 144  
Ala Pro Ser Ala Thr Arg Thr Arg Arg Ser Ala Ser Gln Ala Gly Ser  
35 40 45

aag agc cag gcg gtg gag aag ccg ccg tcg gag aag ccg cgg ctg agg 192  
Lys Ser Gln Ala Val Glu Lys Pro Pro Ser Glu Lys Pro Arg Leu Arg  
50 55 60

cgc tcg tcg ccg cgg gcc cag gag gag ggc ccg ggg gag ccg ccg ccg 240  
Arg Ser Ser Pro Arg Ala Gln Glu Glu Gly Pro Gly Glu Pro Pro Pro  
65 70 75 80

cct gag ctg gcg ttg ctc ccg cca ccg ccg ccg ccg ccg act ccc 288  
Pro Glu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr Pro  
85 90 95

gcg acc ccg acg tcc tcg gcg tcc aac ctg gac ctg ggc gag cag cgg 336

Ala Thr Pro Thr Ser Ser Ala Ser Asn Leu Asp Leu Gly Glu Gln Arg

100

105

110

gag cgc tgg gag acg ttc cag aag cgg cag aag ctt acc tcc gag ggt 384

Glu Arg Trp Glu Thr Phe Gln Lys Arg Gln Lys Leu Thr Ser Glu Gly

115

120

125

gcc gcc aag ctc ctg cta gac acc ttt gaa tac cag ggc ctg gtg aag 432

Ala Ala Lys Leu Leu Leu Asp Thr Phe Glu Tyr Gln Gly Leu Val Lys

130

135

140

cac aca gga ggc tgc cac tgt gga gca gtt cgt ttt gaa gtt tgg gcc 480

His Thr Gly Gly Cys His Cys Gly Ala Val Arg Phe Glu Val Trp Ala

145

150

155

160

tca gca gac ttg cat ata ttt gac tgc aag tac cgg aat tat ata tga 528

Ser Ala Asp Leu His Ile Phe Asp Cys Lys Tyr Arg Asn Tyr Ile

165

170

175

<210> 2

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Arg Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala Lys Leu Arg Gly Gln Lys  
1 5 10 15

Arg Ser Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Ser Ala Ala Ala Leu  
20 25 30

Ala Pro Ser Ala Thr Arg Thr Arg Arg Ser Ala Ser Gln Ala Gly Ser  
35 40 45

Lys Ser Gln Ala Val Glu Lys Pro Pro Ser Glu Lys Pro Arg Leu Arg  
50 55 60

Arg Ser Ser Pro Arg Ala Gln Glu Glu Gly Pro Gly Glu Pro Pro Pro  
65 70 75 80

Pro Glu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr Pro  
85 90 95

Ala Thr Pro Thr Ser Ser Ala Ser Asn Leu Asp Leu Gly Glu Gln Arg  
100 105 110

Glu Arg Trp Glu Thr Phe Gln Lys Arg Gln Lys Leu Thr Ser Glu Gly

115

120

125

Ala Ala Lys Leu Leu Leu Asp Thr Phe Glu Tyr Gln Gly Leu Val Lys

130

135

140

His Thr Gly Gly Cys His Cys Gly Ala Val Arg Phe Glu Val Trp Ala

145

150

155

160

Ser Ala Asp Leu His Ile Phe Asp Cys Lys Tyr Arg Asn Tyr Ile

165

170

175

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 537

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(534)

&lt;400&gt; 3

atg cgg cga tcg agg agc tct gcg gcc gcc aag ctg cgc ggg cag aag 48

Met Arg Arg Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala Lys Leu Arg Gly Gln Lys

1

5

10

15

cgg tcc ggg gcc tcc ggg gcc tcc gcg gcc ccc gcg gcc tcc gcg gcc 96  
 Arg Ser Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Ser Ala Ala  
 20 25 30

gct gcc ttg gca ccc agc gcc acc cgc aca cgg cgc tcc gct agc cag 144  
 Ala Ala Leu Ala Pro Ser Ala Thr Arg Thr Arg Arg Ser Ala Ser Gln  
 35 40 45

gcc ggg agc aag agc cag gcg gtg gag aag ccg ccg tcg gag aag ccg 192  
 Ala Gly Ser Lys Ser Gln Ala Val Glu Lys Pro Pro Ser Glu Lys Pro  
 50 55 60

cgg ctg agg cgc tcg tcg ccg cgg gcc cag gag gag ggc ccg ggg gag 240  
 Arg Leu Arg Arg Ser Ser Pro Arg Ala Gln Glu Glu Gly Pro Gly Glu  
 65 70 75 80

ccg ccg ccg cct gag ctg gcg ttg ctc ccg cca ccg ccg ccg ccg ccg 288  
 Pro Pro Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
 85 90 95

ccg act ccc gcg acc ccg acg tcc tcg gcg tcc aac ctg gac ctg ggc 336  
 Pro Thr Pro Ala Thr Pro Thr Ser Ser Ala Ser Asn Leu Asp Leu Gly  
 100 105 110

gag cag cgg gag cgc tgg gag acg ttc cag aag cgg cag aag ctt acc 384  
 Glu Gln Arg Glu Arg Trp Glu Thr Phe Gln Lys Arg Gln Lys Leu Thr  
 115 120 125

tcc gag ggt gcc gcc aag ctc ctg cta gac acc ttt gaa tac cag ggc 432

Ser Glu Gly Ala Ala Lys Leu Leu Leu Asp Thr Phe Glu Tyr Gln Gly  
130 135 140

ctg gtg aag cac aca gga ggc tgc cac tgt gga gca gtt cgt ttt gaa 480  
Leu Val Lys His Thr Gly Gly Cys His Cys Gly Ala Val Arg Phe Glu  
145 150 155 160

gtt tgg gcc tca gca gac ttg cat ata ttt gac tgc aag tac cgg aat 528  
Val Trp Ala Ser Ala Asp Leu His Ile Phe Asp Cys Lys Tyr Arg Asn  
165 170 175

tat ata tga 537  
Tyr Ile

<210> 4

<211> 178

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Arg Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala Lys Leu Arg Gly Gln Lys  
1 5 10 15

Arg Ser Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Ser Ala Ala  
20 25 30

Ala Ala Leu Ala Pro Ser Ala Thr Arg Thr Arg Arg Ser Ala Ser Gln  
35 40 45

Ala Gly Ser Lys Ser Gln Ala Val Glu Lys Pro Pro Ser Glu Lys Pro  
50 55 60

Arg Leu Arg Arg Ser Ser Pro Arg Ala Gln Glu Glu Gly Pro Gly Glu  
65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
85 90 95

Pro Thr Pro Ala Thr Pro Thr Ser Ser Ala Ser Asn Leu Asp Leu Gly  
100 105 110

Glu Gln Arg Glu Arg Trp Glu Thr Phe Gln Lys Arg Gln Lys Leu Thr  
115 120 125

Ser Glu Gly Ala Ala Lys Leu Leu Leu Asp Thr Phe Glu Tyr Gln Gly  
130 135 140



Leu Val Lys His Thr Gly Gly Cys His Cys Gly Ala Val Arg Phe Glu  
145 150 155 160

Val Trp Ala Ser Ala Asp Leu His Ile Phe Asp Cys Lys Tyr Arg Asn  
165 170 175

Tyr Ile

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 5

gcaagcttgt cgaccatgag ttctgaatgt gatgttgga gctct 45

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 6

ctgacgtaat gtctggagtc gggctgactg

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 7

agccgggcaa gtcttcggtc ctgaccaatg

30

<210> 8

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 8

cggaattcgt cgactgcttt ttagtcttct tatagatata aagg

44

<210> 9

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 9

agagagtagt aacaaaggtc aaagacagtt gactgtatcg atgagttctg aatgtgatgt 60

tg 62

<210> 10

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized

## primer sequence

&lt;400&gt; 10

tggagacttg accaaacctc tggcgaagaa gtccaaagct tatagatata aaggttttac 60

atag 64

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:the sequence of the 5183th(5'  
)

to 5162th(3' ) bases in cloning vector pACT2 (GenBank U29899)

&lt;400&gt; 11

cgcgtttggga atcactacag gg 22

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized

## primer sequence

&lt;400&gt; 12

tatataattc cgg tacttgc ag

22

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 13

taatacgact ataggg

16

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 14

atgcggcgat cgaggagc

18

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 15

gacctggggg agcagcggga g

21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 16

ggtgtccagc agcagcttgg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 17

aaagtggaga ttgttgccat

20

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 18

ttgactgtgc cgttgaatt

19

【 0 0 2 6 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

糖尿病モデルマウスKKAY及びdb/dbと正常マウスにおける筋肉組織でのCAPBP1発

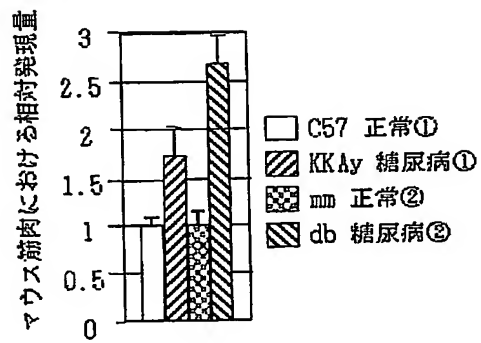
現量の比較を示す図である。



【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、CAPの制御因子を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、CAPに結合する蛋白質を、酵母ツーハイブリッドシステムにより同定した。その結果、骨格筋で発現する蛋白質CAPBP1をコードする新規な塩基配列のcDNAのクローニングに成功した。さらに同蛋白質マウスオルソログのmRNAは糖尿病モデルマウスの筋肉組織において発現量が顕著に増加していることから同蛋白質が糖尿病態の原因因子であることを見出し、本発明を完成した。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-298549
受付番号	50201535940
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年10月15日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年10月11日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-298549

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**